

致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒的中肠感染屏障作用

谢超, 赵彤言*, 董言德, 陆宝麟

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要: 为探讨致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒的中肠感染屏障作用, 通过病毒分离、逆转录聚合酶链反应、透射电镜等技术进行了相关研究。结果表明: 吸食感染性血液后, 登革Ⅱ型病毒能侵染白纹伊蚊中肠上皮细胞并大量复制, 但不能侵染致倦库蚊中肠上皮细胞。以上研究证明致倦库蚊对登革Ⅱ型病毒存在中肠感染屏障。

关键词: 致倦库蚊; 白纹伊蚊; 登革Ⅱ型病毒; 中肠感染屏障

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2002) 02-0160-05

Mesenteron infection barrier to dengue 2 virus in *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

XIE Chao, ZHAO Tong-Yan*, DONG Yan-De, LU Bao-Lin (Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract: The mesenteron infection barrier to dengue 2 virus was examined in *Culex pipiens quinquefasciatus*. Following large dose oral infection, the viral replication was monitored with electron microscopy, and the viral nucleic acid was detected through RT-PCR at intervals in *Cx. pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. The results showed that the virus was replicated rapidly in *Ae. albopictus* after infecting mesenteron epithelial cells. However, dengue 2 virus could not be detected in the same cells and other tissues of *Cx. pipiens quinquefasciatus*, which indicated that the virus was unable to infect and reproduce in it and suggested that the mesenteron barrier to dengue 2 virus infection exist in this species of mosquito.

Key words: *Culex pipiens quinquefasciatus*; *Aedes albopictus*; dengue 2 virus; mesenteron infection barrier

关于致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 能否传播登革Ⅱ型病毒 (dengue 2 virus, DEN-2), 国内外存在的不同认识, 已有专文讨论 (杨佩英和秦鄂德, 1999)。值得注意的是, 唐士元等 (1987) 据经口感染和胸腔接种登革病毒分离分别为阴性和阳性的不同结果, 推论致倦库蚊不能成为有效媒介的原因是由于存在中肠屏障。由于致倦库蚊广布于我国南方及全球热带和亚热带地区, 进一步研究确定致倦库蚊对 DEN-2 中肠屏障的作用具有十分重要的意义。为此, 作者以有效媒介白纹伊蚊为阳性对照, 在大剂量病毒感染的基础上, 通过病毒分离、RT-PCR 检测以及透射电镜等方法, 探讨 DEN-2 侵染这两种蚊虫中肠的规律和致倦库蚊对 DEN-2 的中肠屏障作用。

1 材料与方法

1.1 材料

白纹伊蚊和致倦库蚊: 为本实验室养殖的广州株, 3~6 日龄成蚊。在 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 (80±5)%、光照 14 h/天的养蚊室饲养。病毒: DEN-2, 新几内亚 B 株, 鼠脑传代。

1.2 方法

1.2.1 人工感染蚊虫试验: 取 3~6 日龄白纹伊蚊和致倦库蚊, 饥饿 18~24 h 后, 吸取人工感染鼠脑病毒悬液, 病毒滴度 TCID_{50} 为 $10^{9.07} \sim 10^{10.30}$ 。吸血 1 h, 置 4°C 冷冻 5 min 后立即挑饱血蚊, 饲喂糖水, $29 \pm 1^\circ\text{C}$ 饲喂 21 天。同时设置吸食正常鼠脑悬液的蚊虫为阴性对照, 饲喂方法同感染蚊。

基金项目: 总后“九五”医学杰出中青年基金课题

第一作者简介: 谢超, 女, 1970 年 11 月生, 汉族, 山东人, 博士, 助研, 现从事干细胞研究, E-mail: yuner5426@sina.com

* 通讯作者 Author for correspondence

收稿日期 Received: 2000-07-20; 接受日期 Accepted: 2001-06-10

1.2.2 人工感染蚊虫体内及中肠组织内 DEN-2 的分离与滴度测定: 蚊虫吸食感染性血液后, 分别于 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天收集标本, 50 只/组, 液氮冻存备用, 分别用于整个蚊体内 (10 只/组) 及蚊中肠组织内 (40 只/组) 病毒的分离。解剖蚊中肠后, 以磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 洗 3 次。以 1 mL 无血清 DMEM 培养液分别研磨整个蚊虫和解剖的中肠组织并过滤除菌, 按常规方法将病毒作 10 倍梯度稀释 ($10^{-1} \sim 10^{-12}$), 接种 C6/36 白纹伊蚊细胞系做微量分离培养并测定病毒滴度 $TCID_{50}$ 值, 以吸血 1 h 病毒 $TCID_{50}$ 值为零点作图分析。

1.2.3 RT-PCR 反应检测感染蚊虫体内 DEN-2:

1) 标本收集: 分别于吸食感染性血液后 1、3、5、7、14、21 天收集白纹伊蚊标本, 并于 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天收集致倦库蚊标本。20 只/组, 液氮冻存备用, 另收集正常白纹伊蚊和致倦库蚊各 10 只冻存备用, 作为阴性对照。

2) 特异性引物设计与合成: P1 (上游引物): CTGATTTCAT (A/C/G/T) CC (A/G) TG; P2 (下游引物): AAGCTTGAGATGGACTTT。

3) 人工感染蚊体内病毒 RNA 的提取: 采用 Gibco 公司 TRIzol Reagent 总 RNA 提取试剂, 按说明略加改进提取总 RNA。每组取 10 只感染蚊虫, 加入 1 mL TRIzol 试剂, 迅速研磨, 而后室温静置 5 min; 加 0.2 mL 氯仿剧烈振荡 15 s, 12 000 $\times g$ 离心 15 min; 小心吸取上层水相, 用异丙醇沉淀, 70% 乙醇洗 1 次。提取的 RNA 溶解于适量 DEPC 处理的无菌水中, 测定 OD_{260} 与 OD_{280} 值, 判断 RNA 的质量和纯度, 于 -70°C 储存备用。

4) 病毒 cDNA 第一链合成及 PCR 扩增: 利用 TaKaRa 公司 RNA PCR 试剂盒反转录合成 cDNA 第一链。反应体系 20 μL , 按以下条件进行反转录反应: 42°C , 60 min; 99°C , 5 min; 5°C , 5 min。反转录合成 cDNA 第一链后, 利用 TaKaRa 公司 RNA PCR 试剂盒进行 PCR 扩增, PCR 反应条件如下: 94°C 预变性 5 min; 94°C 1 min; 55°C 1 min; 72°C 1 min, 30 个循环, 72°C 延伸 8 min。PCR 反应结束后, 1.2% 琼脂糖电泳鉴定结果。

1.2.4 透射电镜观察人工感染蚊虫中肠上皮细胞内 DEN-2 感染: 吸食感染性血液后, 分别于 0.5、2、4、8、12、18、24、48 h 和 14 天, 每组取 5 只活蚊 4°C 冰冻 5 min, 解剖拉取中肠, 2.5% 戊二醛室温固定 2 h。磷酸缓冲液 4°C 过夜, 2% 锇酸固定液 4°C 重固定 2 h。磷酸缓冲液彻底漂洗。乙醇脱

水、Epson 包埋后观察切片。

2 结果

2.1 经口感染 DEN-2 后致倦库蚊和白纹伊蚊体内及中肠组织内病毒的分离与测定

2.1.1 人工感染蚊虫体内 DEN-2 的分离与滴度测定 (图 1): 吸血后 1 h 直到 21 天, 均从人工感染病毒的白纹伊蚊体内分离到了 DEN-2。吸血后 1 h, 白纹伊蚊体内病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 $10^{9.07}$, 感染 1 天后病毒 $TCID_{50}$ 值降至 $10^{4.69}$ 。而 5 天后白纹伊蚊体内的病毒滴度 $TCID_{50}$ 达到峰值为 $10^{8.30}$, 表明此时病毒在其体内已大量复制。至吸血后 21 天, 仍在白纹伊蚊体内检测到病毒, 并维持在一定的水平 ($TCID_{50}$ 为 $10^{5.42}$)。吸血后 1 h 至 1 天, 从致倦库蚊体内亦分离到了病毒, 病毒滴度 $TCID_{50}$ 分别为 $10^{9.44}$ 和 $10^{3.24}$; 但吸血后 2 天直至第 21 天, 从致倦库蚊体内一直未检测到病毒。说明 DEN-2 能感染并在白纹伊蚊体内复制, 却不能感染致倦库蚊。

2.1.2 人工感染蚊虫中肠组织内 DEN-2 的分离与滴度测定 (图 2): 自吸血后 1 天直到 21 天, 均从吸食病毒的白纹伊蚊中肠内分离到 DEN-2。吸血后 1 天, 白纹伊蚊中肠内病毒滴度 $TCID_{50}$ 为 $10^{5.69}$; 3 天后中肠内病毒滴度达峰值, $TCID_{50}$ 值为 $10^{7.87}$, 表明此时病毒在其中肠上皮细胞内已大量复制。之后病毒滴度开始降低, 第 5 天和第 7 天的病毒滴度维持在较高的水平, $TCID_{50}$ 值分别为 $10^{7.15}$ 和 $10^{7.07}$ 。至吸血后 21 天, 仍在白纹伊蚊中肠内检测到病毒, 并维持在一定的水平 ($10^{5.21}$)。而吸食感染性血液后 1 天, 从致倦库蚊体内亦分离到了病毒, 病毒滴度为 $10^{4.15}$, 但吸血后 2 天直至第 21 天, 从致倦库蚊中肠内一直未检测到病毒。说明 DEN-2 能感染白纹伊蚊中肠上皮细胞并进行大量复制, 但不能感染致倦库蚊中肠组织。

2.1.3 RT-PCR 检测人工感染蚊体内 DEN-2 的核酸: 吸血后 1、3、5、7、14、21 天均从白纹伊蚊研磨液中扩增出约 500 bp 的特异病毒核酸片段 (图 3: A); 在吸血 1 h 和 1 天后的致倦库蚊研磨液内亦扩增出 500 bp 左右的特异条带 (图 3: B), 但吸血后 3 天至 21 天, 均未扩增出特异条带。这一结果与病毒分离结果一致, 提示吸血 3 天后, 致倦库蚊体内没有病毒存活、复制, 因此检测不到病毒核酸。

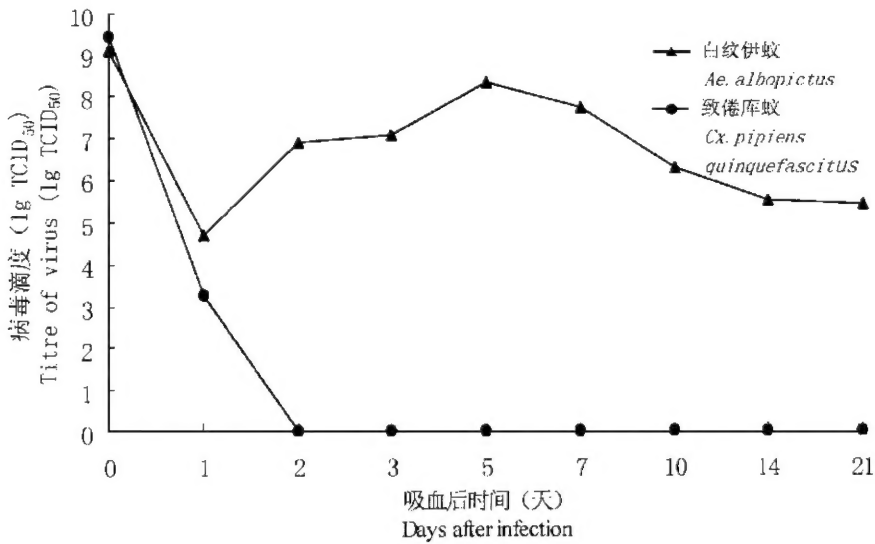


图 1 经口感染后不同时间致倦库蚊和白纹伊蚊蚊体内 DEN-2 生长曲线

Fig. 1 Growth curves of DEN-2 in *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens quinquefasciatus* after oral infection

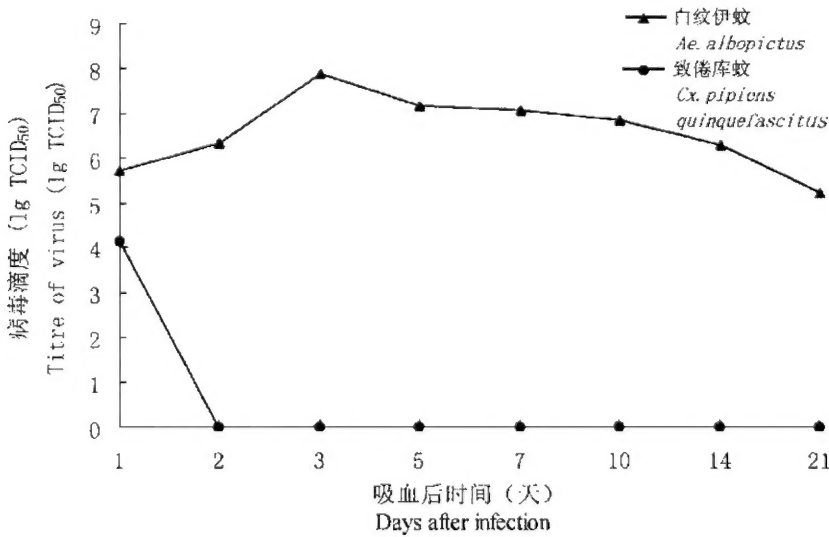


图 2 经口感染后不同时间致倦库蚊和白纹伊蚊中肠组织内 DEN-2 生长曲线

Fig. 2 Growth curves of DEN-2 in mesenteron of *Ae. albopictus* and *Cx. pipiens quinquefasciatus* after oral infection

2.1.4 经口感染 DEN-2 后蚊虫中肠上皮细胞内 DEN-2 感染的透射电镜观察：白纹伊蚊吸食感染性血液后 2 h，在靠近上皮细胞膜内、外侧部位，均观察到裸露的病毒粒子，有些空泡内也有病毒粒子（图 4：A）。12~18 h，细胞核内出现与病毒复制有关的核内带状丝，细胞内亦出现大量空泡，这与病毒蛋白合成及复制有关，此时病毒已在中肠上皮细胞内大量复制。有些空泡内有散在分布的病毒粒子，细胞质内则有由病毒核衣壳构成的晶状体结

构，有的晶状体结构由多达上千个病毒核衣壳均匀排列构成（图 4：B），一个细胞内可观察到很多这样的晶状体结构。感染后 48 h 以及经过一定的潜伏期（14 天）后，在白纹伊蚊上皮细胞内，仍观察到晶状体结构的病毒以及散在的病毒颗粒（图 4：C），提示病毒在该蚊上皮细胞内可持续存活并复制。而致倦库蚊吸食感染性血液以后，整个观察期间（即使经过一定的外潜伏期），均未在其上皮细胞内以及围食膜内发现 DEN-2，说明 DEN-2 无法

侵入并感染致倦库蚊中肠上皮细胞。

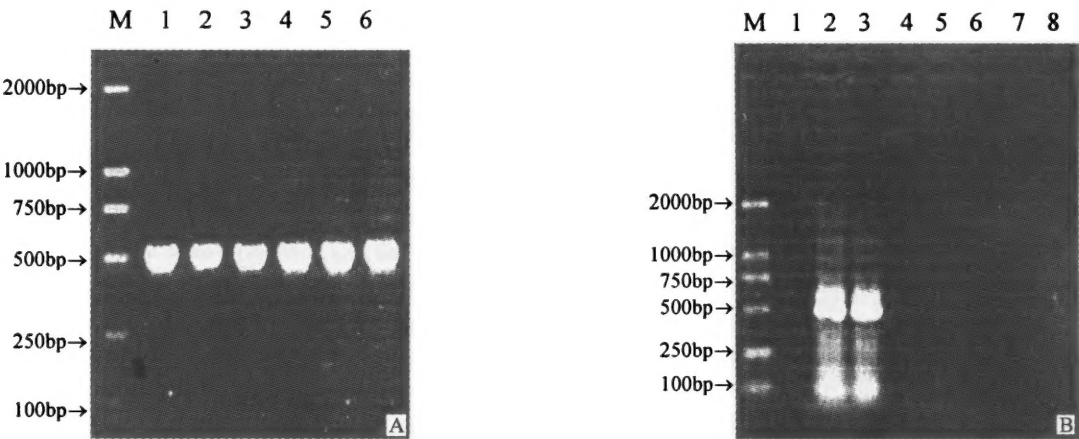


图3 白纹伊蚊 (A) 和致倦库蚊 (B) 体内 DEN-2 的 RT-PCR 检测

Fig. 3 RT-PCR detection of DEN-2 in *Ae. albopictus* (A) and *Cx. pipiens quinquefasciatus* (B) at different times after oral infection

A. M: TaKaRa DL2000 PCR 标准 (TaKaRa DL2000 Marker); 1~6: 分别为感染 1、3、5、7、14、21 天的白纹伊蚊 (in 1, 3, 5, 7, 14, and 21 day(s) after infection with DEN-2, respectively); B. M: TaKaRa DL2000 PCR 标准 (TaKaRa DL2000 Marker); 1: 阴性对照 (control); 2~8: 分别为感染 1 h 和 1、3、5、7、14、21 天的致倦库蚊 (in 1 h, and 1, 3, 5, 7, 10, 14, and 21 day(s) after infection with DEN-2, respectively)

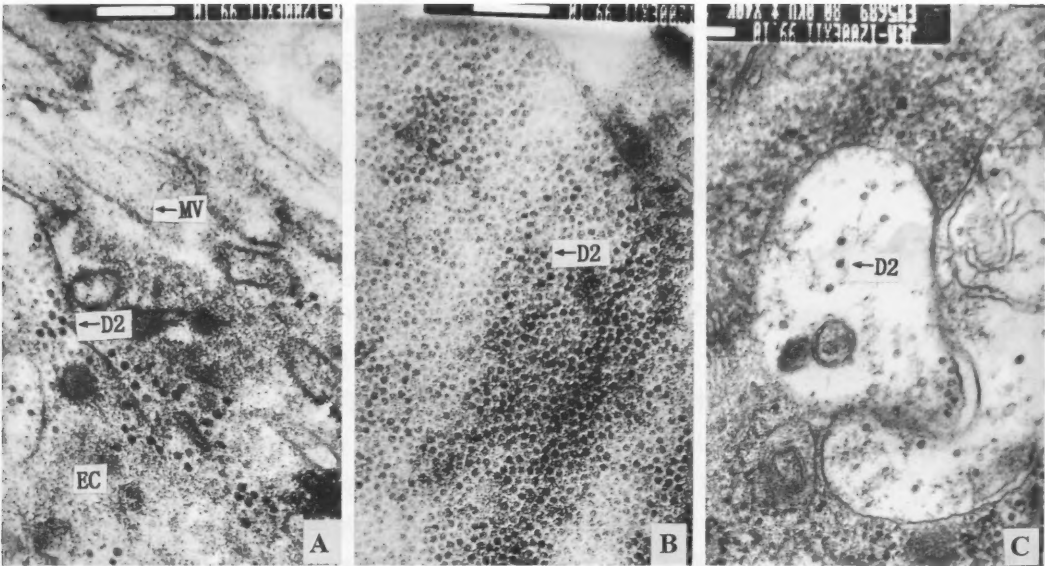


图4 白纹伊蚊中肠上皮细胞内 DEN-2 透射电镜观察

Fig. 4 Electron-microscopic observation on distribution of DEN-2 in mesenteron epithelial cells of *Ae. albopictus*

A. 吸血后 2 h (2 h after oral infection); B. 吸血后 18 h (18 h after oral infection); C. 吸血后 48 h (48 h after oral infection)
D2: Dengue 2 virus; EC: 上皮细胞 epithelial cell; MV: 微绒毛 microvillar

3 讨论

在自然界中，因蚊虫对虫媒病毒（如 DEN 病毒）存在一系列的屏障作用，而完全不受病毒感染

染，其中“中肠感染屏障”是限制许多虫媒病毒感染蚊虫媒介的主要因素之一（Leake, 1992; Mclean, 1955）。本研究通过病毒分离、滴度测定、RT-PCR 检测等方法，从多方面证实在相同感染条件下，DEN-2 能迅速侵染白纹伊蚊中肠等组织

并大量复制,却不能侵染致倦库蚊中肠组织。整个试验期间(即使经过一定的外潜伏期),均未在致倦库蚊蚊体及中肠组织内分离到病毒,也未检测到病毒核酸。本试验是在大剂量病毒($10^{8.9} \sim 10^{10.5}$ TCID₅₀)感染的基础上进行的,病毒滴度远高于常见的脊椎动物病毒血症。致倦库蚊中肠组织不能感染病毒并非因病毒感染剂量低所致。由此可见,致倦库蚊对 DEN-2 病毒确实存在中肠感染屏障。

蚊虫在病毒感染中的中肠屏障,包括中肠胰蛋白酶、围食膜和(或)上皮细胞受体以及病毒从上皮细胞逸出及通过基底膜等因素(Hardy *et al.*, 1983)。从本研究结果来看,由于致倦库蚊感染 DEN-2 病毒后,病毒未能进入中肠细胞。因此,在中肠屏障中起作用的因素应该是胰蛋白酶、围食膜或(和)中肠细胞受体。这三者中何者起主导作用有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Hardy J L, Houk E J, Kramer L D, 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Ann. Rev. Entomol.*, 28: 229 - 262.
- Leake C J, 1992. Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. *Parasitol. Today*, 8 (4): 123 - 128.
- McLean D M, 1955. Multiplication of viruses in mosquitoes. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 31: 481 - 490.
- Tang S Y, Zhang Q E, Li P *et al.*, 1987. The study on the vector competency to dengue virus of several mosquitoes in China. *Bull. Acta Mili. Med. Sci.*, 11 (6): 458 - 462. [唐士元, 张启恩, 李平等, 1987. 我国几种蚊虫对登革病毒媒介效能的实验研究. 军事医学科学院院刊, 11 (6): 458 - 462]
- Yang P Y, Qin E D, 1999. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. Beijing: People's Military Medical Sciences Press. 98-200. [杨佩英, 秦鄂德, 1999. 登革热和登革出血热. 北京: 人民军医出版社. 98 - 200]